

HELICOBACTER PYLORI-REMOVING MEDICAMENT**Publication number:** JP2001002578 (A)**Publication date:** 2001-01-09**Inventor(s):** KIMURA MASAKI; KANEKO TSUTOMU; HIRATA HARUHISA; KOGA YASUHIRO**Applicant(s):** KOGA YASUHIRO; MEIJI MILK PROD CO LTD; WAKAMOTO PHARMA CO LTD**Classification:****- international:** C12N1/20; A61K35/74; A61P1/04; A61P31/04; A61P35/00; C12N1/20; A61K35/66;
A61P1/00; A61P31/00; A61P35/00; (IPC1-7): A61K35/74; A61P1/04; A61P31/04;
A61P35/00; C12N1/20**- European:****Application number:** JP19990178672 19990624**Priority number(s):** JP19990178672 19990624**Abstract of JP 2001002578 (A)**

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject medicament excellent in the ability to kill Helicobacter pylori (hereafter, abbreviated as H. pylori) and defensive action to H. pylori infection and suitable to long-term intake thereof by including a specific lactic acid bacteria (product containing the bacteria and/or treatment product thereof) having the high ability to remove H. pylori.; **SOLUTION:** This medicament contains at least one selected from the group consisting of lactic acid bacteria belonging to the genus Lactobacillus gasseri having the high ability to remove H. pylori, products containing the above bacteria (e.g. lactic acid bacteria suspensions, lactic acid bacteria-cultured products, lactic acid bacteria culture liquids, lactic acid bacteria-fermented milks) and treatment products thereof (e.g. concentrates, pasted products, dried products, liquid products, diluted products); wherein a preferable strain is Lactobacillus gasseri OLL 2716 strain (FERM P-17399). The amount of the active ingredient to be formulated in a medicament is normally 0.0001-10 wt.%.

Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-2578

(P2001-2578A)

(43)公開日 平成13年1月9日(2001.1.9)

| | | | |
|--------------------------|------|---------------|--------------------------|
| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マコ-ト ⁵ (参考) |
| A 6 1 K 35/74 | | A 6 1 K 35/74 | A 4 B 0 6 6 |
| A 6 1 P 1/04 | | A 6 1 P 1/04 | 4 C 0 8 7 |
| 31/04 | | 31/04 | |
| 35/00 | | 35/00 | |
| C 1 2 N 1/20 | | C 1 2 N 1/20 | E |

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 9 頁)

| | | |
|----------|-----------------------|--|
| (21)出願番号 | 特願平11-178672 | (71)出願人 59908/855 古賀 泰裕 神奈川県伊勢原市望星台 東海大学医学部 内 |
| (22)出願日 | 平成11年6月24日(1999.6.24) | (71)出願人 000006138 明治乳業株式会社 東京都中央区京橋2丁目3番6号 |
| | | (71)出願人 000100492 わかもと製薬株式会社 東京都中央区日本橋室町1丁目5番3号 |
| | | (74)代理人 100075775 弁理士 戸田 親男 |
| | | 最終頁に統く |

(54)【発明の名称】 Helicobacter pylori除菌性医薬品

(57)【要約】

【解決手段】 Helicobacter pylori除菌能の高いLactobacillus gasseri(FERMP-17399)に属する乳酸菌を有効成分とするH. pyloriの除菌性及び／又は感染防御性医薬品。

【効果】 該乳酸菌自体又はそれを用いて調剤した医薬品は、H. pyloriの除菌性及び／又は感染防御性にすぐれ、長期間摂取するのに適している。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 *Helicobacter pylori*除菌能の高い*Lactobacillus gasseri*に属する乳酸菌、該乳酸菌含有物、その処理物の少なくともひとつを含有してなること、を特徴とする*Helicobacter pylori*の除菌性及び／又は感染防御性医薬品。

【請求項2】 *Helicobacter pylori*除菌能が高く、低pH環境に耐性を有し、経口投与組成物とした際に生残性が高い*Lactobacillus gasseri*に属する乳酸菌、該乳酸菌含有物、その処理物の少なくともひとつを含有してなること、を特徴とする*Helicobacter pylori*の除菌性及び／又は感染防御性医薬品。

【請求項3】 乳酸菌が*Lactobacillus gasseri* OLL 2716であること、を特徴とする請求項1又は2に記載の医薬品。

【請求項4】 乳酸菌含有物が、乳酸菌懸濁液、乳酸菌培養物、乳酸菌培養液、乳酸菌発酵乳から選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬品。

【請求項5】 処理物が、濃縮物、ペースト化物、乾燥物（噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物から選ばれる少なくともひとつ）、液状物、希釀物から選ばれる少なくともひとつであること、を特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の医薬品。

【請求項6】 医薬品が抗胃炎剤又は抗潰瘍剤であること、を特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の医薬品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori* : 以下、*H. pylori*あるいはピロリ菌ということもある) の除菌及び／又は感染防御効果を有するラクトバチルス・ガッセリ (*Lactobacillus gasseri* : 以下、*L. gasseri*ということもある) を含有する医薬品に関する。

【0002】

【従来の技術】1983年にWarrenら (Lancet, I. 1273 (1983)) によって胃内に棲息する細菌として*H. pylori*が発見されて以来、*H. pylori*と慢性胃炎、胃潰瘍および十二指腸潰瘍との関係につき注目されるようになった。最近では、スナネズミに*H. pylori*を感染させると発ガン物質の投与なしで胃腺ガンが発生する事実が認められており (Watanabe et al., Gastroenterology, 115; 642(1988))、胃ガンの起因菌としても*H. pylori*との関連が指摘されている。

【0003】一方、*H. pylori*陽性の消化性潰瘍患者に対して*H. pylori*の除菌を行うと消化性潰瘍の再発が抑制されることが明らかになりつつあり、欧米では積極的な*H. pylori*の除菌療法が実施されている。*H. pylori*の除菌法としては、抗生物質（β-ラクタム剤系、アミノー配糖

体系、マクロライド系、テトラサイクリン系等）と抗潰瘍剤を併用する方法が一般的であり、例えば、抗生物質2種（クラリスロマイシン-メトロニダゾールまたはアモキシシリソ）と胃酸の分泌を抑制するプロトンポンプ阻害剤（PPI）を投与する3剤併用法が臨床的に実施されている。しかし、除菌治療を目的に抗生物質等の薬剤を投与することの最大の問題点は、薬剤耐性を有する*H. pylori*の出現頻度の増加と高用量の薬剤を多剤併用することによる下痢やアレルギー等の重篤な副作用の出現である。

【0004】そこで、抗生物質に代わる胃内*H. pylori*の除菌を目的に、ラクトフェリンを投与する方法（特開平10-130164）、*H. pylori*のウレアーゼ、鞭毛を抗原として鶏に免疫して得た特異抗原を用いる方法（特開平10-287585）、ならびに、乳酸菌を用いた方法として、*Lactobacillus brevis*および／又は*Lactobacillus salivarius*（特開平9-241173）、*Lactobacillus acidophilus*（特開平6-98782）それぞれの特定菌株の生菌を投与する方法につき検討がなされている。しかしながら、満足すべきものは未だ報告されていない。

【0005】一方、乳酸菌は好ましい香味物質を産生するとともに乳酸やバクテリオシン等の抗菌性物質産生能を有していることから、古来より発酵乳等を介して世界各地で食されてきた極めて安全性の高い微生物である。従って、乳酸菌の有する抗菌力をを利用して*H. pylori*の除菌を行うことは、副作用を伴わずに手軽で有効な方法として医学的にも極めて意義のあることである。

【0006】しかし、既存の発明、特に*Lactobacillus brevis*および／又は*Lactobacillus salivarius*（特開平9-241173）については、乳酸菌株の選定に際して、*H. pylori*のターゲット部位である胃内環境（低pH下での環境に耐性を有する）という特性が考慮されていないのみならず、該乳酸菌株を使用した発酵乳等の食品としての特性（乳酸菌株の生残性、香味、物性）についても何ら考慮されていない。また、*Lactobacillus acidophilus*については、臨床試験に用いた結果、有効性が認められなかつた旨報告されている (Bazzoli et al., Gastroenterology, 102, No.4, A38, (1992))。一方、特開平6-98782号公報に開示された菌株*L. acidophilus* La1の培養上清を臨床試験に用いた結果、*H. pylori*の除菌の可能性は示唆されたものの、その持続効果については明らかにされていない。(Michetti et al., Gastroenterology, 108, No.4, A166, (1995))。上記のように、既存の乳酸菌では、目的とする*H. pylori*除菌用組成物を調製するには未だ改良の余地が多く残されているのが現状である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、抗胃炎や抗胃潰瘍等の面からも、ピロリ菌の除菌／感染防御シ

ステムの確立が希求されている当業界の現状に鑑み、安全性、経口摂取等の面から再度乳酸菌に着目し、乳酸菌を用いるピロリ菌の除菌／感染防御システムを新たに開発することとした。

【0008】すなわち、本発明が解決しようとする課題は、ピロリ菌の除菌および感染防御を目的に、胃内での生残性と定着性が高く、モデル動物試験において明らかに抗H.pylori活性を有しており、発酵乳等の食品に利用した際の特性（乳酸菌株の生残性、香味、物性）が高い乳酸菌株を選定し、該乳酸菌株を用いた医薬品を新たに提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記した課題を解決するためになされたものであって、本発明者らは、目的とする乳酸菌をスクリーニングするに際し、次のような基準を新たに設定し、鋭意選定作業を行った。すなわち、本発明者らは、ヒト腸内由来の数多くの乳酸桿菌のうち、① 胃酸耐性が高い、② 低pH条件下での生育が良好である、③ H.pyloriのヒト胃癌細胞MKN45付着抑制能が高い、④ H.pyloriと混合培養した際にH.pylori増殖阻害能が高い、⑤ H.pylori感染モデルマウスに投与した際にH.pyloriの除菌能が高い、⑥ 食品に適用した際に生残性が高く、香味、物性も優れている菌株の選定につき鋭意研究を重ねた結果、これらの条件に合致する菌株としてLactobacillus gasseri OLL 2716株（本菌株は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-17399として寄託された。）を見出した。本菌株の菌学的性質は、以下のとおりである。

【0010】A. 形態的性状

細胞形態：桿菌

運動性：なし

胞子の有無：なし

グラム染色性：陽性

【0011】

B. 生理学的性状（陽性：+、陰性：-、弱陽性：w）

カタラーゼ -

ガス産生 -

15°Cでの生育 -

グルコン酸資化性 -

乳酸旋光性 DL

好気性発育 +

【0012】

C. 炭水化物発酵性（陽性：+、陰性：-、弱陽性：w）

アラビノース -

| | |
|--------|---|
| キシロース | - |
| ラムノース | - |
| リボース | - |
| グルコース | + |
| マンノース | + |
| フルクトース | + |
| ガラクトース | + |
| シュクロース | + |
| セロビオース | + |
| ラクトース | + |
| トレハロース | + |
| メリビオース | - |
| ラフィノース | - |
| メリチトース | - |
| スターチ | w |
| マンニトール | - |
| ソルビトール | - |
| デキストリン | w |

【0013】D. 遺伝学的特性

DNA中のグアニン（G）+シトシン（C）含量は36.4%である。また、L.gasseri OLL 2716をTannockらの方法（Microbial. Ecol. Health Dis., 8:79-84, 1995; Appl. Environ. Microbiol., 62:4608-4613, (1996)）に準じて、培養後に菌体をアガロースプラグに固定し、溶解後、ゲノムDNAを制限酵素（Apa I）で分解して、パルスフィールドゲル電気泳動（CHEF-DR II BIO-RAD）を行ったところ、図1のバンドパターンを示した。図中、AはL.gasseri OLL 2716株を示し、Bはサイズマーカーを示す。

【0014】E. 胃酸耐性

胃酸耐性試験は以下の通りに実施した。すなわち、ろ過滅菌したpH 2.0の人工胃液〔0.2%NaCl、0.35%ペプシン（1:5000）を精製水で溶解〕9mLにMRS Broth(DIFCO)で2回賦活培養(37°C、18時間)し、生理食塩水で2回洗浄したL.gasseri OLL 2716株の菌体懸濁液1mLを添加し、好気的に37°Cで2時間接触後、1mLをpH 6.5のリン酸緩衝液(6.7 mM)9mLに添加し反応を停止させた。次に、初発菌数および人工胃液に接触後の菌数をMRS agarを用いて計測し、生残率を算出した。本法によりヒト腸内由来の乳酸桿菌（150株）のなかで最も高い胃酸耐性を示したL.gasseri OLL 2716株につき、他の菌株の胃酸耐性とを比較したところ、L.gasseri OLL 2716株の胃液耐性が最も高かった（表1）。

【0015】

(表1) 各種乳酸桿菌の人工胃液耐性

| 菌 株 | 2時間処理後の生残率(%) |
|--------------------------------|---------------|
| Lactobacillus gasseri OLL 2716 | 0.53 |

| | |
|---|-------|
| Lactobacillus acidophilus JCM 1132T | 0.48 |
| Lactobacillus rhamnosus GG(ATCC 53103) | 0.018 |
| Lactobacillus salivarius WB1004(FERM P-15360) | 0.004 |
| Lactobacillus brevis WB 1005(FERM P-15361) | 0.18 |

【0016】F. 低pH条件下での生育

MRS Brothで2回賦活培養(37°C、18時間)したL.gasseri OLL 2716株を変法MRS Broth(0.2%NaCl、0.35%ペプシン(1:5000)をMRS Brothで溶解後、pH 4.0に調整)に10μl接種

(表2) 低pH条件下での各種乳酸桿菌の生育

| 菌 株 | 9時間培養後のOD ₆₅₀ |
|--|--------------------------|
| Lactobacillus gasseri OLL 2716 | 0.255 |
| Lactobacillus acidophilus JCM 1132T | 0.030 |
| Lactobacillus rhamnosus GG(ATCC 53103) | 0.222 |
| Lactobacillus salivarius JCM 1231 | 0.116 |

【0018】G.ヒト胃癌細胞(MKN45)に対する付着能
L.gasseri OLL 2716株ならびにL.acidophilus CNCM I-1225のヒト胃癌細胞MKN45への付着能を、乳酸菌のヒト大腸癌細胞への付着能を調べたGranatoらの方法(Appl. Environ. Microbiol., 65(3), 1071-1077, (1999))に準じて検討した。MKN45を、10%FCSを含むRPMI1640培地(RPMI、日水製薬)10mlを用いて37°Cで3日間培養した。培養後、細胞を剥がし、RPMIで洗浄後、細胞濃度が5×10⁴個/mlになるようにRPMIに懸濁させ、96穴マイクロプレートに1穴あたり0.1ml分注した。さらに37°Cで3日間培養後、マイクロプレートに付着したMKN45を0.1Mリン酸緩衝液(pH6)で洗浄し、MKN45の単層を調製した。この单

(表3) Lactobacillus gasseri OLL2716株のヒト胃癌細胞に対する付着能

| 菌 株 | MKN45細胞100個当たりの付着菌数 (平均±標準偏差) |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| Lactobacillus gasseri OLL2716 | 560±55** |
| Lactobacillus acidophilus CNCM I-1225 | 234±30 |

**: p<0.01 (Student's t test, n=4)

【0020】L.gasseri OLL 2716株は、ヒト胃内環境において胃酸耐性が高く、かつ低pH条件下での生育が良好であり、該菌株の生菌を医薬品(抗胃炎剤、抗潰瘍剤)又は食品(発酵乳、液状、ペースト状、乾燥品)としてヒトに投与した際に、H.pyloriの除菌および宿主への感染を防御することによって胃炎または胃・十二指腸潰瘍の発症または再発を防止することが可能な菌株として選択したものである。そこで、L.gasseri OLL 2716株の抗H.pylori活性、ヨーグルトとしての製造特性(保存性、風味、物性)、ならびにH.pylori感染モデルマウス

し、好気的に37°Cで培養した。培養9時間後に増殖度として培地の濁度(OD₆₅₀)を測定した。その結果、L.gasseri OLL 2716株は、低pH条件下において最も良好な生育を示した(表2)。

【0017】

層にMRS broth(DIFCO)で培養後、10⁹CFU/mlとなるよう0.1Mリン酸緩衝液(pH6)に懸濁したL.gasseri OLL2716株もしくはL.acidophilus CNCM I-1224懸濁液0.1mlを加えて、37°C、30分間インキュベートした。MKN45の単層を0.1Mリン酸緩衝液(pH6)で3回洗浄して、付着しなかった乳酸菌を除去した後、グラム染色し、顕微鏡を用いて、MKN45に付着した乳酸菌数をカウントした。その結果、L.gasseri OLL 2716株のMKN45への付着菌数は、L.acidophilus CNCM I-1225より高いことを認めた。すなわち、L.gasseri OLL2716株は、ヒト胃癌細胞に対して高い付着能を有することが確認された(表3)。

【0019】

L.gasseri OLL 2716株を投与した際のH.pyloriの除菌効果を、例を挙げて詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0021】すなわち本発明は、Helicobacter pylori(ピロリ菌)除菌能の高いLactobacillus gasseriに属する乳酸菌、該乳酸菌含有物、その処理物の少なくともひとつを含有してなること、を特徴とするピロリ菌の除菌性及び/又は感染防御性医薬品に関するものである。

【0022】乳酸菌含有物としては、乳酸菌懸濁液；乳酸菌培養物(菌体、培養上清液、培地成分を含む)；乳

酸菌培養物から固形分を除去した乳酸菌培養液；乳酸菌飲料、酸乳、ヨーグルト等乳酸菌発酵した飲食品からなる乳酸菌発酵乳；等が挙げられる。

【0023】処理物としては、乳酸菌、乳酸菌含有物、発酵乳の濃縮物、ペースト化物、乾燥物（噴霧乾燥物、凍結乾燥物、真空乾燥物、ドラム乾燥物等）、液状物、希釈物等が挙げられる。また、乳酸菌としては、生菌体、湿潤菌、乾燥菌等が適宜使用可能である。

【0024】本発明に係る医薬品は、乳酸菌、含有物、処理物の少なくともひとつを有効成分として含有してなるものである。

【0025】有効成分の医薬品における配合量は、任意でよいが、使用目的（予防、保健、又は治療）、患者の年齢、投与方法、剤形等に応じて適宜定めればよく、通常、0.0001～10%の範囲が適当である。しかしながら、長期間に亘って保健上ないし健康維持の目的で摂取する場合には、上記範囲よりも少量であってもよいし、また本有効成分は、安全性について問題がないので、上記範囲よりも多量に使用しても一向にさしつかえない。現にマウスを用いた10日間の急性毒性試験の結果、5000mg/kg/日の経口投与でも死亡例は認められなかった。

【0026】医薬品には、本有効成分をそのまま、使用したり、賦形剤等と混合使用することができる。本有効成分を用いる本発明に係る医薬品は、固体状（粉末、顆粒状その他）、ペースト状、液状ないし懸濁状のいずれでもよい。

【0027】医薬品において、本有効成分は、種々の形態で投与される。その投与形態としては例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与をあげることができる。これらの各種製剤は、常法に従って主薬に賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤、懸濁剤、コーティング剤などの医薬の製剤技術分野において通常使用しうる既知の補助剤を用いて製剤化することができる。その使用量は症状、年齢、体重、投与方法および剤形等によって異なるが、通常は、成人に対して、1日当たり、経口投与の場合には $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12} \text{ c f u}$ 程度投与すればよい。

【0028】本発明において、医薬品、例えば、抗胃炎剤、抗潰瘍剤として、L.gasseri OLL 2716株の生菌製剤（散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、シロップ剤等）を単独で投与することが可能であるが、抗生素質、プロトンポンプ阻害剤、その他の抗胃炎剤、抗潰瘍剤、他の薬剤とともに投与してもよい。

【0029】

【実施例1】L.gasseri OLL 2716株によるH.pylori NCTC 11637株のヒト胃癌細胞（MKN 45）付着抑制を、Kabirらの方法（Gut, 41(1); 49-55, (1997)）に準じて実施した。

【0030】はじめに、H. pylori NCTC 11637株の蛍光

標識菌液を調製するために、微妙気条件下で、5% FCS (Fetal Calf Serum) を含むBrucella broth (DIFCO) を用い、2回賦活培養（37°C、72時間）したH. pylori NCTC 11637株をPBSで洗浄後、細胞蛍光標識キットPKH-2（大日本製薬）のDiluent AにOD₆₅₀が2.0となるように懸濁した。微妙気培養は、Helicobacter培養用ガス発生袋アネロパック・ヘリコ（三菱ガス化学）を用いて実施した。この懸濁液1m1に蛍光標識色素PKH-2を50μl添加し、室温で15分間反応させた後、遠心分離（3000 rpm、10 min）によって菌体を回収し、ハンクス平衡塩溶液（HGS）で洗浄後、HGS 1m1に懸濁し、蛍光標識菌液とした。次に、MKN 45の細胞浮遊液（1×10⁶ c e 1 l s/m1）O.8m1にH. pylori NCTC 11637株の蛍光標識菌液（OD₆₅₀=2.0）O.1m1およびL.gasseri OLL 2716株の菌液（OD₆₅₀=4.0）O.1m1を同時に添加し、37°Cで好気的に1時間振とうした。プランクにはMKN 45の細胞浮遊液O.8m1+HGS O.2m1）、陰性対照にはL.gasseri OLL 2716株の菌液の代わりにHGSを添加したもの用いた。振とう後、15% sucroseを含むDulbeccoのPBS（組織培養の技術（第6刷）、朝倉書店、pp 20 (1991)）を9m1添加し、遠心分離（1000 rpm、10 min）によって細胞を回収し、HGSで遠心洗浄（1000 rpm、10 min）後、再度HGS 1m1に懸濁し、96穴の蛍光測定用マイクロプレートのウェルに懸濁液を250μl添加し、蛍光プレートリーダーで蛍光強度（励起波長：490 nm、測定波長：530 nm）を測定した。

【0031】その結果、H. pylori NCTC 11637株単独での胃癌細胞への付着率を100%としたとき、L.gasseri OLL 2716株を添加した系でのH. pylori NCTC 11637株の付着率は、92.8%となり、本菌株がH. pyloriの胃癌細胞への付着抑制効果を有することが確認された。

【0032】

【実施例2】L.gasseri OLL 2716株によるH. pylori NCTC 11637株の増殖抑制試験として、5% FCSを含むBrucella broth (DIFCO) 200m1に2回賦活培養したH. pylori NCTC 11637株およびL. gasseri OLL 2716株をそれぞれ10⁶ colony forming units (CFU)/m1および10⁵ CFU/m1となるように接種し、37°C、微妙気条件下で培養した。培養開始O.24、48時間後のH. pylori NCTC 11637株およびL.gasseri OLL 2716株の生菌数を計測した。H. pylori NCTC 11637株およびL.gasseri OLL 2716株の検出にはそれぞれ変法Skirrow培地（Horse Blood (7%)、BHI agar (52g)、Trimethoprim (5mg/1)、Polymyxin B (2500 U/m1)、Vancomycin (10mg/1)、Bacitracin (5mg/1)、精製水 (1000m1) (37°C、7日間、微妙気培養) およびMRS agar (37°C、48時

間、嫌気培養）を用いた。

【0033】その結果、*H. pylori* NCTC 11637株の単独では培養48時間後に生菌数が約5倍に増殖したのに対し、*L. gasseri* OLL 2716株が共存すると、*H. pylori* N

CTC 11637株の菌数が10分の1程度に減少し、*L. gasseri* OLL 2716株は*H. pylori* NCTC 11637株の増殖抑制能を有することが確認された（表4）。

【0034】

（表4）*Lactobacillus gasseri* OLL 2716株による*Helicobacter pylori* NCTC 11637株の増殖抑制効果

| 菌 株 | 0h | 24h | 48h |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637 | 1.5×10^6 | 3.3×10^8 | 7.9×10^8 |
| <i>Helicobacter pylori</i> 増殖率(%) | 100 | 220.0 | 526.7 |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> OLL 2716 | 2.2×10^5 | 7.4×10^7 | 4.5×10^7 |
| <i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637 | 1.9×10^6 | 1.2×10^6 | 1.8×10^5 |
| <i>Helicobacter pylori</i> 増殖率(%) | 100 | 63.2 | 9.5 |

【0035】

【実施例3】*H. pylori* は尿素を分解してアンモニア産生能を有することから強い酸性条件下でも生残し得ることが明らかとなっている。そこで、尿素存在下での*L. gasseri* OLL 2716株による*H. pylori* NCTC 11637株の増殖抑制能を調べるために、低pH条件下での本菌株ならびに*Lactobacillus acidophilus* CNM I-1225の*H. pylori* NCTC 11637株に対する増殖抑制効果について検討した。5%FCSおよび5mM尿素を含むBrucella broth (pH 4.0) 200mlに2回賦活培養した*H. pylori* NCTC 11637株および*L. gasseri* OLL 2716株もしくは*L. acidophilus* CNM I-1225株をそれぞれ 10^5 CFU/m1および 10^7 CFU/m1となるように接種し、3

7°C、微好気条件下で培養した。培養開始0、6、12時間後の*H. pylori* NCTC 11637株、*L. gasseri* OLL 2716株、*L. acidophilus* CNM I-1225株それぞれの生菌数を測定した。

【0036】その結果、培養6時間と培養12時間において、尿素存在下での*L. gasseri* OLL 2716の*H. pylori* NCTC 11637に対する増殖抑制能は、*L. acidophilus* CNM I-1225株よりも高いことを認めた。すなわち、*L. gasseri* OLL 2716株は、尿素存在下においても*H. pylori* に対して高い増殖抑制能を有することが確認された（表5）。

【0037】

（表5）尿素存在下での*Lactobacillus gasseri* OLL 2716による*Helicobacter pylori* の増殖抑制効果

| 菌 株 | 0h | 6h | 12h |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| <i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637 | 2.0×10^5 | 2.0×10^5 | 1.8×10^5 |
| <i>Helicobacter pylori</i> 増殖率(%) | 100 | 100 | 90.0 |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> OLL 2716 | 1.5×10^7 | 4.0×10^7 | 1.2×10^8 |
| <i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637 | 2.0×10^5 | 1.5×10^5 | 3.0×10^4 |
| <i>Helicobacter pylori</i> 増殖率(%) | 100 | 75.0 | 15.0 |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> CNM I-1225 | 1.6×10^7 | 2.5×10^7 | 8.9×10^7 |
| <i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637 | 2.0×10^5 | 1.9×10^5 | 1.0×10^5 |
| <i>Helicobacter pylori</i> 増殖率(%) | 100 | 95.0 | 50.0 |

【0038】

【実施例4】*L. gasseri* OLL 2716株、*L. salivarius* WB 1004 (FERM P-15360) の生菌投与による*H. pylori* の除菌効果を in vivo 系で調べる目的で、無菌マウス

(BALB/c) 1個体当たり *H. pylori* NCTC 11637株を 1×10^9 CFU 感染させて4週間経過した *H. pylori* 感染モデルマウスに、*L. gasseri* OLL 2716株、*L. salivarius* WB 1004 (FERM P-15360) 株それぞれを 1 ×

10^9 CFU/1個体を1週目に3回、2週目から7週目までは各週に1回それぞれ投与した。L. gasseri OLL 2716株又はL. salivarius WB 1004 (FERM P-15360) 株の生菌投与8週間後に、マウス胃内のH. pylori数、L. gasseri OLL 2716株数又はL. salivarius WB 1004 (FERM P-15360) 株数をそれぞれ変法Skirrow培地、MR Sagarで計測するとともに、酵素免疫測定法 (ELISA) にて血清中の抗H. pylori抗体価(492 nmにおける吸光度)を調べた。

【0039】その結果、対照マウス (H. pyloriのみを投与) の胃内H. pylori数が8週間後に 10^5 CFU/g以上検出されたのに対し、L. gasseri OLL 2716株、L. salivarius WB 1004 (FERM P-15360) 株それぞれを

生菌投与したマウスは、H. pylori数は検出限界値以下 (10^3 CFU/g以下) に減少した。しかし、L. gasseri OLL 2716株投与マウスの抗H. pylori抗体価は対照マウスに比較して1/5以下に低下し、L. salivarius WB 1004 (FERM P-15360) 株の抗H. pylori抗体価に比較しても1/4以下であった。(表6)。従って、L. gasseri OLL 2716株によるH. pyloriの除菌効果は、L. salivarius WB 1004 (FERM P-15360) 株に比較して高いことを認めた。一方、L. gasseri OLL 2716株の投与8週目のマウスの胃内から投与したL. gasseri OLL 2716が 10^6 /g以上検出されたことから、本菌株は胃内定着能を有することを確めた。

【0040】

(表6) 乳酸桿菌の胃内定着数とHelicobacter pylori NCTC 11637の除菌効果

| マウス | 胃内容物中の菌数(Log CFU/g) | | | 抗H. pylori抗体価 A492 |
|--|---------------------|---------------|----------------|-----------------------|
| | L. salivarius | L. gasseri | H. pylori | |
| 対照(N=5、 乳酸菌無投与) | 検出せず | 検出せず | 5.2 ± 0.04 | 0.488 ± 0.284 - |
| Lactobacillus gasseri OLL 2716 投与(N=6) | 検出せず | 6.1 ± 1.0 | <3.0 | 0.086 ± 0.082 - |
| Lactobacillus salivarius WB 1004 (FERM P-15360) 投与(N=5) | 6.1 ± 0.8 | 検出せず | <3.0 | 0.346 ± 0.276 |

* P<0.05 (Scheffe test)

【0041】

【実施例5】L. gasseri OLL 2716株をMR S液体培地 (Difco社製) 5 Lに接種後、37°C、18時間静置培養を行った。培養終了後、7,000 rpm、15分間遠心分離を行い、培養液の1/50量の濃縮菌体を得た。次いで、この濃縮菌体を脱脂粉乳10% (重量)、グルタミン酸ソーダ1% (重量) を含む分散媒と同量混合し、pH 7に調整後、凍結乾燥を行った。得られた凍結乾燥物を60メッシュのフリイで粉体化し、凍結乾燥菌末を得た。

【0042】

【実施例6】第13改正日本薬局方解説書製剤総則「散剤」の規定に準拠し、上記実施例で得られたL. gasseri OLL 2716株の凍結乾燥菌末1 gにラクトース (日局) 400 g、パレイショデンプン (日局) 600 gを加えて均一に混合し、散剤を製造した。

【0043】

【実施例7】次の配合により抗潰瘍剤を製造した。

(1) 本菌株の脱脂粉乳培地における培養物の凍結乾燥

物50 g、(2) ラクトース90 g、(3) コーンスター 29 g、(4) ステアリン酸マグネシウム1 g。先ず、(1)、(2)、(3) (但し17 g) を混合し、(3) (但し7 g) から調製したペーストとともに顆粒化した。得られた顆粒に(3) (但し5 g) と(4) を加えてよく混合し、この混合物を圧縮錠剤機により圧縮して、1錠あたり有効成分を40 mg含有する錠剤100個を製造した。

【0044】

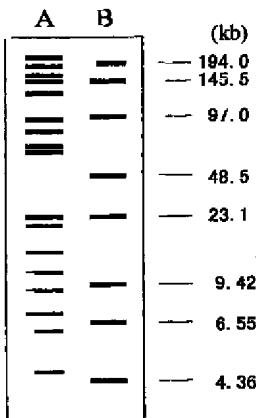
【発明の効果】本発明によれば、ピロリ菌の除菌及び又は感染防御が副作用を伴うことなく効率的に実施できる。本発明に係る医薬品は、安全性には全く問題はない、各種形態に自由に調剤することができるので、健常者はもとより、乳幼児、老齢者、病弱者、病後の人等も長期間に亘って摂取することができ、胃炎や胃潰瘍等に特にすぐれた予防及び/又は治療効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】Lactobacillus gasseri OLL 2716ゲノムのDNAのApa I分解パターン (パルスフィールド電気泳動)

を示す。

【図1】



【手続補正書】

【提出日】平成11年10月21日(1999.10.21)

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【手続補正1】

【補正内容】

【補正対象書類名】明細書

【0034】

(表4) *Lactobacillus gasseri* OLL 2716株による*Helicobacter pylori* NCTC 11637株の増殖抑制効果

| 菌 株 | 0h | 24h | 48h |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637 | 1.5×10^6 | 3.3×10^6 | 7.9×10^6 |
| <i>Helicobacter pylori</i> 増殖率(%) | 100 | 220.0 | 526.7 |
| | | | |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> OLL 2716 | 2.2×10^5 | 7.4×10^7 | 4.5×10^7 |
| <i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637 | 1.9×10^6 | 1.2×10^6 | 1.8×10^6 |
| <i>Helicobacter pylori</i> 増殖率(%) | 100 | 63.2 | 9.5 |

【手続補正書】

【提出日】平成12年2月2日(2000.2.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正内容】

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記した課題を解決するためになされたものであって、本発明者は、目的とする乳酸菌をスクリーニングするに際し、次のような基準を新たに設定し、銳意選定作業を行った。

すなわち、本発明者らは、ヒト腸内由来の数多くの乳酸桿菌のうち、①胃酸耐性が高い、②低pH条件下での生育が良好である、③*H. pylori*のヒト胃癌細胞MKN45付着抑制能が高い、④*H. pylori*と混合培養した際に*H. pylori*増殖阻害能が高い、⑤*H. pylori*感染モデルマウスに投与した際に*H. pylori*の除菌能が高い、⑥食品に適用した際に生残性が高く、香味、物性も優れている菌株の選定につき銳意研究を重ねた結果、これらの条件に合致する菌株として*Lactobacillus gasseri* OLL 2716株（本菌株は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6999として寄託されている。）を見出した。本菌株の菌学

【書類名】 受託番号変更届
【提出日】 平成12年2月2日(200
0.2.2)
【旧寄託機関の名称】通商産業省工業技術院 生命工学
工業技術研究所

【旧受託番号】 FERM P-17399
【新寄託機関の名称】通商産業省工業技術院 生命工学
工業技術研究所
【新受託番号】 FERM BP-6999

フロントページの続き

(72)発明者 木村 勝紀
東京都東村山市栄町1-21-3 明治乳業
株式会社中央研究所内

(72)発明者 金子 勉
東京都東村山市栄町1-21-3 明治乳業
株式会社中央研究所内

(72)発明者 平田 晴久
神奈川県足柄上郡大井町金手378番地 わ
かもと製薬株式会社相模研究所内

(72)発明者 古賀 泰裕
神奈川県伊勢原市望星台 東海大学医学部
内
Fターム(参考) 4B065 AA30X AC05 AC20 BA22
BB24 CA44
4C087 AA01 AA02 BC56 MA17 MA23
MA28 MA35 MA37 MA41 MA43
NA14 ZA66 ZA68 ZB26